77-82

2374(16

动 物 学 研 究 1992, 13(1):77—82
Zoological Research

ISSN 0254—5853
CN 53—1040/Q

MNNG转化赤麂细胞株(KIZ-8401)的生长特性和核型观察

刘爱华 林世英 熊习昆
(中国科学院昆明动物研究所 650107)

Q953

摘要 本文用MNNG (N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)(甲基硝基亚硝基胍)转化赤麂肺成纤维细胞株(KIZ-7901)。转化的赤麂细胞株(KIZ-8401)具有新的核型,2n=8♂,细胞形态,细胞周期以及生物学特性都与未转化的细胞株(2n=7♂)不一样。转化细胞中还常见多倍体出现,细胞具有克隆生长能力。

关键词: MNNG,转化,赤麂细胞,核型

赤麂(*Muntiacus muntjac*)二倍体细胞株(KIZ-7901)曾用作细胞遗传学(施立明等,1980),进化遗传学(施立明,1976; Shi Liming, 1980),细胞生物学(邓承宗等,1980;朱柄富等,1980),遗传毒理学(施立明等,1980),细胞融合(段幸生等,1983)以及病毒感染赤麂细胞(KIZ-7901)的实验研究(王虹等,1984)。赤麂细胞株显示了广阔的应用前景。Yamaguchi等(1979)用SV_{40}病毒转化印度赤麂肾细胞并对其特性进行过研究。由于体外培养细胞的转化受环境因素的影响比较简单、易于控制,因此可用于从细胞水平和分子水平癌变机理的研究,也可用于检测各种物理、化学和生物等诱变因子的致癌性。

本实验以不同浓度的化学诱变剂"MNNG"处理赤麂肺成纤维细胞(KIZ-7901),得到了一株其核型和生物学特性发生变化的细胞。

材料与方法

一、细胞来源 自一只幼年雄性赤麂肺组织建立的细胞株(KIZ-7901)(施立明等,1981)复苏传代备用。培养液为"TC-199"(日本产)液85%,新生牛血清15%,青霉素100单位/ml,链霉素10μg/ml,37°C温箱培养。

二、MNNG处理 MNNG(N-甲基-N'-硝基-亚硝基胍),半井化学药品株式会社出品。培养基配制,浓度为200μg/ml。实验分3个组,A组:2μg/ml,B组:1μg/ml和C组:不加MNNG的对照组,每组3瓶细胞。细胞传代后48小时分别加入上述浓度的MNNG,24小时后洗弃,更换新鲜培养液继续培养。从处理后的第5天开始,每周进行

本文1990年10月11日收到,1991年4月4日修回。

1次细胞传代。用0.25%胰蛋白酶（Difco 1:250）消化，制成细胞悬液后，同组3瓶细胞混匀，再分传。B组（1 μg/ml）细胞从处理后第27天开始细胞生长加快，按1：2分传，同时分别于44、52、90、100、120天冻存细胞，此株细胞命名为KIZ-8401。A组（2 μg/ml）始终处于生长缓慢状态，120天时已不能生长成单层。空白对照组的细胞从60天开始也只能按1:1分传，120天后细胞生长活力下降（表1）。

三、细胞生物学特性观察 1.分裂指数测定：放消毒的载片于培养瓶内，接种后1、2、3、4、5、6天分别取出载片，0.85%生理盐水清洗，甲醇固定，Giemsa染色，每个时间点计数2000个细胞中分裂相的数目（表2）。

2.细胞分裂周期的测定：用Brdu标记的姐妹染色单体分化技术测定细胞周期，加入的Brdu浓度为8 μg/ml，细胞传代后37°C培养，并于28、36、48、60、72、84、96小时分别收获细胞，每个时间点观察100个中期细胞，统计第一（M_1）、第二（M_2）、第三（M_3）次分裂周期的细胞比例（表3）。

表1 MNNG转化赤麂细胞（KIZ-8401）的传代观察

Tab. 1 Observations of the passages in Indian muntjac cells (KIZ-8401) transformed with MNNG

分组	天数						
	5	12	27	44	60	90	120
A: 2 μg/ml	1:1	1:1	1:1	1:1	2:3	1:1	不能形成单层
B: 1 μg/ml	3:4	1:1	1:2	1:2	1:2	1:2 1:3	1:2
C: 空白对照组	1:2	1:2	1:2	1:2	1:1	1:1	1:1

表2 赤麂细胞（KIZ-7901）和（KIZ-8401）的有丝分裂指数（%）

Tab. 2 Mitotic index of Indian muntjac cells (KIZ-7901) and (KIZ-8401) (%)

细胞株	接种后天数					
	1	2	3	4	5	6
KIZ-7901	32.00	21.00	9.00	4.70	1.50	6.00
KIZ-8401	27.00	19.00	17.00	92.00	19.00	19.00

表3 赤麂细胞（KIZ-7901）和（KIZ-8401）细胞周期动力学观察

Tab. 3 Observation on the cell cycle in Indian muntjac cells (KIZ-7901) and (KIZ-8401)

加入Brdu培养时间（小时）	观察细胞数（个）	M-1		M-2		M-3	
		KIZ 7901	KIZ 8401	KIZ 7901	KIZ 8401	KIZ 7901	KIZ 8401
28	100	99.5	99.0	1.0	0	0	0
36	100	83.5	90.0	16.5	10.0	0	0
48	100	69.4	90.0	30.3	10.0	0.3	0
60	100	54.1	74.0	41.9	26.0	4.0	0
72	100	32.4	56.0	52.5	42.0	14.4	2.0
84	100	22.4	56.0	47.5	37.0	18.7	7.0

3.克隆形成：按Edlinger法（大星章一，1979）进行在培养液中的克隆形成率的观察，接种细胞浓度分别为5×10^2/瓶、1×10^3/瓶、5×10^3/瓶、1×10^4/瓶，每组两瓶细胞（表4）。

四、细胞遗传学分析　在细胞生长的对数期，加入秋水仙素，最终浓度为0.4—0.6μg/ml，处理4小时，按常规方法收获细胞，制备染色标本和进行核型分析。

表4　赤麂细胞（KIZ-7901）和（KIZ-8401）克隆形成率的观察

Tab. 4 Clone rate of Indian muntjac cells (KIZ-7901) and (KIZ-8401)

接种细胞数(瓶)	克隆形成率（%）	
	KIZ-8401	KIZ-7901
5×10^2	0.2	0
1×10^3	10.6	0
5×10^3	10.3	0
1×10^4	12.3	0

结果和讨论

以往离体细胞的转化实验多以啮齿类动物成纤维细胞为材料，常用的有叙利亚地鼠成纤维细胞（SHF）、仓鼠、大鼠、小鼠等（李申德等，1979），人类的成纤维细胞虽然来源方便、易于培养，但由于人类成纤维细胞DNA修复能力比啮齿类动物强，染色体畸变率低，又缺少体外激活能力，因此不易发生转化。Yamaguchi和Huh（1979）用SV_{40}病毒转化印度麂肾细胞，并分裂出了几个转化细胞系。本实验利用化学诱变剂MNNG处理赤麂（KIZ-7901）肺成纤维细胞得到了一个细胞系（KIZ-8401）。与正常的二倍体赤麂细胞株（KIZ-7901）比较，转化细胞有一系列新的生物学特性。

1.细胞形态由典型的成纤维细胞变为梭形，伸展性差，核大小不匀，巨核多见，方向性消失，密度依赖性抑制消失（图版Ⅰ）。

2.粘附性变差，易脱落，又可重新贴壁生长。

3.有克隆形成能力，KIZ-8401细胞的克隆形成率为0.2%—12.3%，而KIZ-7901无克隆形成能力（表4）。用SV_{40}转化的赤麂肾细胞克隆形成率为0.2%—40%。

4.有丝分裂指数：从表2结果可以看出，KIZ-8401细胞接种后1天和4天生长旺盛。分裂指数分别高达27%和92%，5天和6天也仍然具有较高的分裂细胞，而KIZ-7901细胞的分裂高峰在24小时，然后逐渐下降。5天和6天时细胞很少分裂（表2）。

5.细胞周期的观察：刘瑞清等（1983）关于赤麂肺成纤维细胞周期动力学和姐妹染色单体交换率的研究结果表明，赤麂（KIZ-7901）肺成纤维细胞一个细胞周期约为22小时。而转化的KIZ-8401细胞一个细胞周期约为26.0小时。后者细胞周期表现出一定的延迟。

MNNG转化的赤麂细胞（KIZ-8401）的染色体分析：

1.染色体数目和形态：染色体数目除原2n＝7♂的外，出现了X染色体从复合的Y_1

上断离而形成的2n＝8♂的新核型（图版Ⅱ），核型组成为一对大中着丝粒染色体（1号），一对近端着丝粒染色体（2号），一对端着丝粒染色体（原Y_1染色体或3号）和XY性染色体。有趣的是随着传代次数的增加新核型的比例越趋增高（表5），在复苏的赤麂细胞（KIZ-8401），新核型的比例仍保持30%左右。多倍体细胞的比例占绝对优势，畸变细胞率增高（表6）。

表5 MNNG转化赤麂细胞（KIZ-8401）二倍体数目变化

Tab. 5 Changes of the diploid number in Indian muntjac cells (KIZ-8401) transformed with MNNG

染色体数目	天数					
	36	42	52	62	91	117
2n＝7♂	80.0	50.0	10.0	5.0	8.0	60.0(%)
2n＝8♂	19.0	48.0	90.0	95.0	92.0	40.0(%)
其他	1.0	2.0	0	0	0	0(%)

表6 MNNG转化赤麂细胞（KIZ-8401）的染色体分布

Tab. 6 Distribution of chromosomal numbers in Indian muntjac cells (KIZ-8401) transformed with MNNG

代数	染色体分布			新核型比例	畸变细胞率
	2n＝7	2n＝8	2n＞8	(%)	(%)
F_5	3	0	97	21.6	1.00
F_{10}	7	2	91	31.0	4.00
F_{15}	8	4	88	29.0	8.00
F_{20}	2	0	98	33.0	8.00
F_{25}	0	0	100	25.0	6.00
F_{30}	2	0	98	23.0	8.00

2.带型分析：KIZ-8401细胞的染色体G-，C-，Ag-带表明X性染色体确系由复合染色体Y_1上断下来的具有双着丝粒的染色体。

赤麂（KIZ-7901）肺成纤维细胞具有典型正常细胞的生物学特性和二倍体核型（施立明，1981），自发畸变率低。受直接致癌物MNNG处理后细胞不仅出现了明显的形态变化（图版Ⅰ），染色体数目和组成也相应发生了明显变化（表5、6），出现了一个2n＝8♂的新核型（图版Ⅱ）和较多的多倍体，畸变细胞率增高。转化细胞株KIZ-8401的染色体大，每条染色体都具有明显的个体性，用常规染色方法即可清晰无误一一加以区分，分裂指数较高，容易生长传代，是比较理想的细胞遗传学、遗传毒理学和细胞癌变生物学研究的好材料。

致谢 本工作在施立明研究员指导下进行。

图版说明

图版Ⅰ：A．赤麂（KIZ-7901）细胞的形态（相差显微镜观察）

B．MNNG转化的赤麂细胞（KIZ-8401）Giemsa染色

图版Ⅱ：赤麂细胞株（KIZ-7901）和（KIZ-8401）的染色体带型

A．KIZ-7901　Giemsa-染色核型

B．KIZ-8401　Giemsa-染色核型

C．G-带核型

D．C-带核型

E．Ag-带核型

参考文献

大星章一等主编　人癌细胞培养。P38—40　科学出版社。

王　虹、郭仁等　1984　脊髓灰质炎病毒感染赤麂（KIZ-7901）细胞株的实验研究。实验生物学报　12:195—206。

刘瑞清、刘爱华　1983　赤麂成纤维细胞的细胞动力学和姐妹染色单体交换率的研究。动物学研究　4（4）:309—314。

邓承宗、刘爱华等　1980　赤麂外周血淋巴细胞常染色质和异染色质中姐妹染色单体交换的分布。动物学报　26（4）:301—305。

朱炳富、刘爱华等　1980　赤麂和小麂♀×赤麂♂的杂种外周血淋巴细胞动力学和姐妹染色单体交换率的研究。实验生物学报　13（2）:127—130。

李申德等　1979　用甲基硝基亚硝基胍在体外诱发金仓鼠乳鼠肺细胞的恶性转化。实验生物学报　12（2）:195—206。

施立明　1976　赤麂的核型。动物学报　22（1）:166。

施立明、张锡然等　1980　赤麂、小麂和人的染色体辐射敏感性比较。遗传　2（1）:5—6。

施立明、贺维顺等　1980　赤麂（*Muntiacus muntjac*）离体测定化合物诱变活力的研究。动物学研究　1（3）:297—302。

施立明、刘爱华等　1981　赤麂（*Muntiacus muntjac*）细胞株的建立及其生物学特性观察。动物学研究　2（2）:105—112。

段幸生等　1983　间期核染色体期前凝聚现象的观察。动物学报。29（1）:24—27。

Yamaguchi N. *et al*. 1979 Establishment and characterization of Indian Muntjak cell lines transformed with Simian Virus 40 *J. gen virol* 42, 289—296.

Shi Liming *et al*. 1980 Comparative cytogenetic studies on the red muntjac and their F_1 hybrids. *Cytogenet. Cell Genet*. 26:22—27.

OBSERVATIONS ON NEW CELL LINE OF *Indian muntjac* TRANSFORMED WITH MNNG

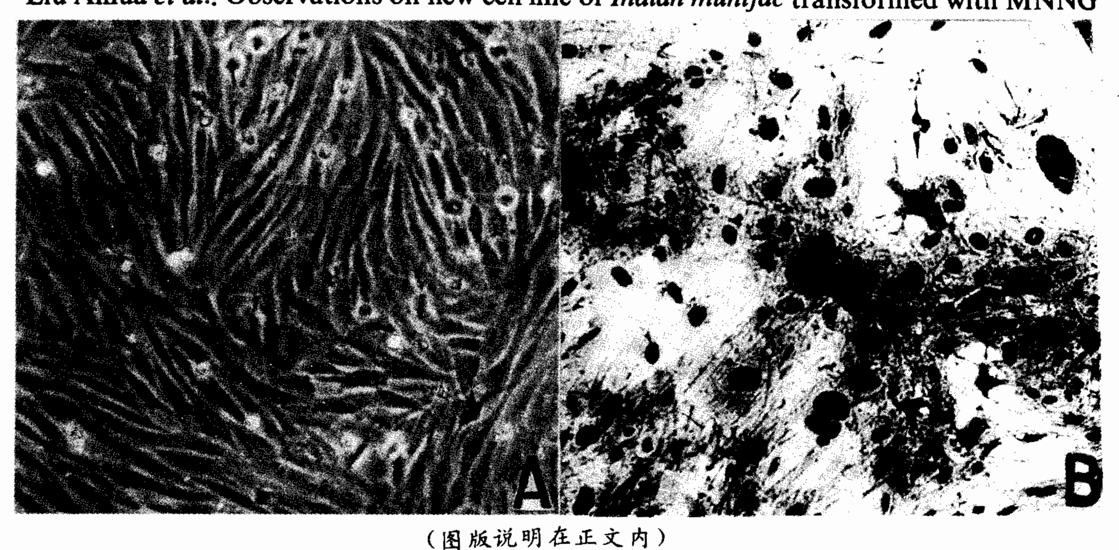
Liu Aihua Lin Shiying Xiong Xikun
(*Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica* 650107)

Lung fibroblast line of *Indian muntjac* (KIZ-7901) was transformed with MNNG (N-Methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine). The transformed Indian muntjac cells (KIZ-8401) possessed the new karyotype with chromosome number of 8 in male and polyploid. The morphology and cell cycle as well as mitotic index in MNNG-transformed muntjac cells were different from diploid cell line of Indian muntjac (KIZ-7901). Moreover, the MNNG-transformed muntjac cells possessed colony-forming capacity in vitro.

Key words: MNNG, Transformation, Indian muntjac cell line, Karyotype

图版 I　　刘爱华等：MNNG 转化赤麂细胞株（KIZ—8401）的生长特性和核型观察

Liu Aihua *et al*.: Observations on new cell line of *Indian muntjac* transformed with MNNG



（图版说明在正文内）

图版 I　　颉东旭：中华大蟾蜍卵球受精过程中的细胞学研究

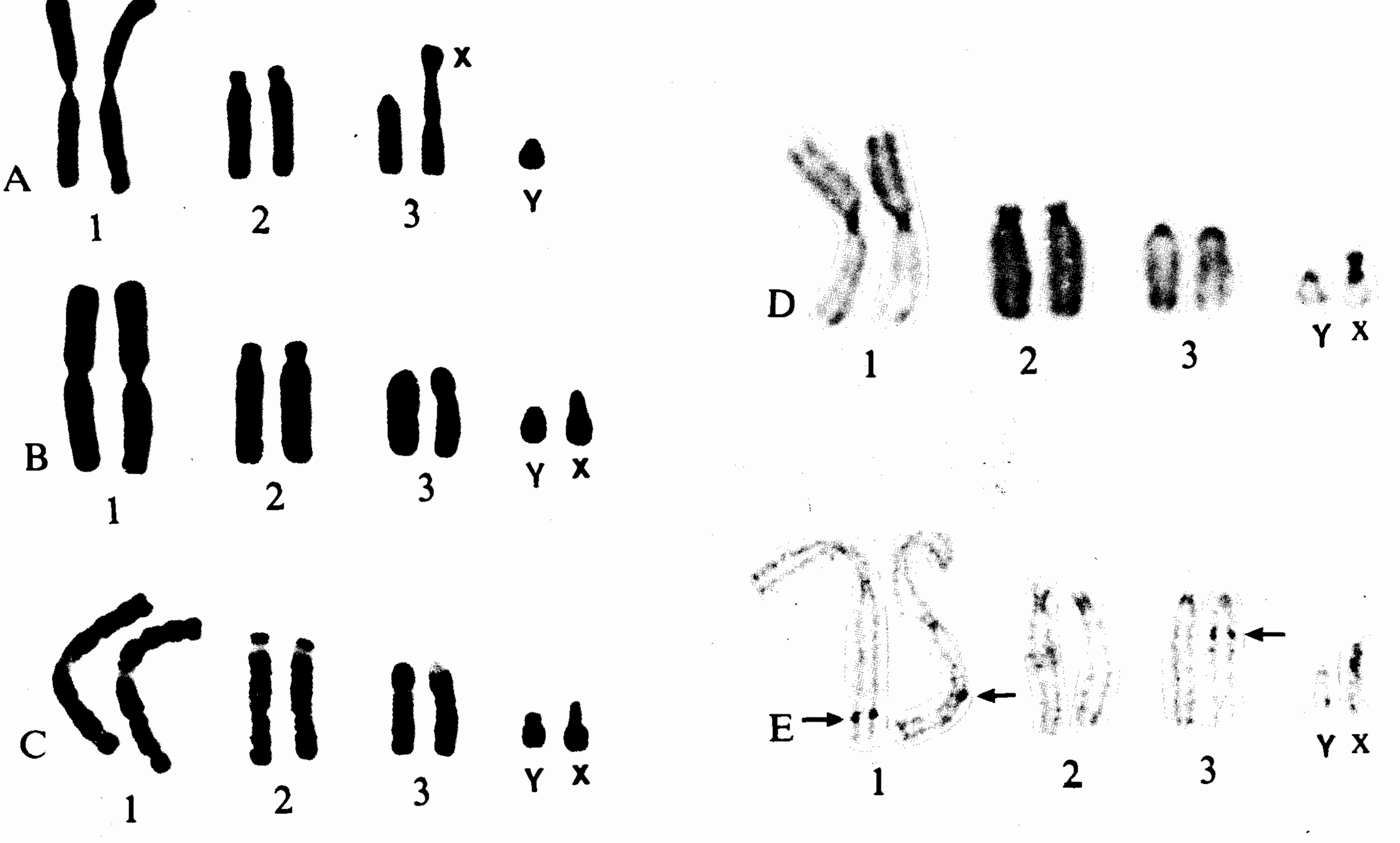
Xie Dongxu *et al*.: Cytological studies of the fertilization in *Bufo bufo gargarizans*

1 2 3 4 5 6 7 8

（图版说明在正文内）

刘爱华等：MNNG 转化赤麂细胞株（KIZ—8401）的生长特性和核型观察

图版Ⅱ　Liu Aihua *et al*.:Observations on new cell line of *Indian muntjac* transformed with MNNG



（图版说明在正文内）